

**Posudek na diplomovou práci Bc. Jany Levé:
„Imunomodulační účinky extraktů z helminta na střevní buněčnou linii potkaního modelu“**

Předložená diplomová práce se zabývá studiem účinků tří typů extraktů z tasemnice *Hymenolepis diminuta* na *in vitro* kulturu střevních epiteliálních buněk z potkana s cílem porovnat produkci vybraných cytokinů v neindukovaných kulturách a kulturách, ve kterých byla lipopolysacharidem indukovaná zánětlivá odpověď. Předložená diplomová práce je součástí komplexní studie zaměřené na prevenci a terapii idiopatických střevních zánětů, která je intenzivně řešena Laboratoří parazitární terapie Parazitologického ústavu Biologického centra AVČR, v.v.i.

Diplomová práce je tradičně rozdělena do hlavních kapitol úvod, cíl práce, materiál a metody, výsledky, diskuze, závěr, seznam použitých zkratk a seznam použité literatury, které obsahují celou řadu podkapitol. Celkový rozsah práce činí 60 stran.

Úvodní část diplomové práce je zpracována přehledně, přičemž čtenáře postupně seznámí s principy helmintoterapie, mechanismy imunomodulace helminty, jejím využitím ke zlepšení klinického průběhu imunitně zprostředkovaných onemocnění, a druhy dosud testovaných helmintů včetně *H. diminuta*, kterému se autorka věnuje podrobněji v posledním oddílu úvodu.

Cíl práce je jasně formulován do jednoho hlavního bodu, který je následně rozdělen do tří dílčích chronologicky řazených bodů, jejichž postupné splnění bylo nezbytné ke splnění hlavního cíle, jmenovitě určení časových bodů vhodných pro analýzu účinků extraktů z *H. diminuta*, otestování vhodné koncentrace použitých extraktů a nakonec otestování imunomodulačních účinků extraktů *in vitro*.

Kapitola materiál a metody obsahuje soupis použitého materiálu a chemikálií a hlavních postupů a metod používaných během řešení vytyčené problematiky včetně přístrojového vybavení a grafického zpracování časového plánu jednotlivých provedených dílčích experimentů.

Výsledky jsou podrobně zpracovány a jsou rozděleny podle vytyčených dílčích cílů a metodických postupů do jednotlivých podkapitol.

V diskuzi autorka hodnotí své výsledky a konfrontuje je s výsledky ostatních autorů zabývajících se helmintoterapií.

Závěr shrnuje nejdůležitější výsledky, které odpovídají jednotlivým vytyčeným cílům práce.

Ke cti autorky bych rád zmínil, že předložená diplomová práce obsahuje pouze minimum překlepů a pravopisných chyb, což již patří ke standardu diplomových prací z pracoviště školitele.

K autorce mám několik věcných dotazů:

- 1. Proč autorka zvolila k aktivaci buněk koncentraci 1 µg LPS/ml média? S tím souvisí i otázka, proč autorka nechala LPS v kulturách buněk po celou dobu experimentu, přičemž standardně se používá jednorázová aktivace až 100× nižší koncentrací LPS a následná výměna za čisté médium, ve vašem případě s obsahem extraktů? Nemohla vysoká koncentrace LPS společně s dlouhou dobou působení zapříčinit degradaci buněčné kultury, kterou autorka zmiňuje?**
- 2. Podle jaké hodnoty byla přepočítávána relativní genová exprese jednotlivých cytokinů? Jinými slovy, co bylo bráno jako kalibrátor (100% genová exprese)?**

3. Jak si autorka vysvětluje zvýšenou produkci TNF α u LPS-neaktivovaných buněk v případě ES a EL extraktů na obrázku 9?

Závěr: Předloženou diplomovou práci považuji za zdařilou, splňující vytyčené cíle. Výsledky diplomové práce Bc. Jany Levé představují základní data potřebná pro další studium imunoterapie v *in vitro* modelu *H. diminuta* v laboratoři školitele.

Předložená diplomová práce Bc. Jany Levé splňuje veškeré požadavky kladené na diplomové práce na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a **doporučuji ji k obhajobě.**

V Českých Budějovicích, 30. 4. 2019


RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Jany Levé:

Imunomodulační účinky extraktů z helminta na střevní buněčnou linii potkaního modelu

V předložené diplomové práci je zkoumán vliv exkrečních/sekrečních produktů a extraktů z larev a dospělců tasemnice *Hymenolepis diminuta* na genovou expresi TNF- α , IL-17re a IL-33 střevními epiteliálními buňkami získanými z potkana. Střevní buňky byly stimulovány lipopolysacharidem nebo byly ponechány nestimulované. Řešená problematika je v souladu s výzkumnými cíli Laboratoře parazitární terapie, mezi něž patří právě studium vlivu nepatogenních střevních parazitů na některá imunitně zprostředkovaná onemocnění.

Diplomová práce, tvořená 60 stranami, je standardně členěna na úvod, cíl práce, materiál a metody, výsledky, diskuzi, závěr, seznam použitých zkratk a seznam použité literatury. Na první pohled práce působí úpravným dojmem, snad jen podkapitoly kapitoly diskuze by mohly být číslovány podobně jako je tomu u předchozích kapitol a všechny literární prameny v seznamu použité literatury by mohly být odděleny mezerami.

Práce je psaná čtivě, obsahuje poměrně malé množství překlepů a jen minimum pravopisných chyb. Místo se nicméně objevují neobratné či nejednoznačné výrazy, které nejsou příliš vhodné pro odborný text. Některá použitá tvrzení navíc nejsou správná. Například pokud vím, larva se šesti háčky se označuje jako onkosféra či hexakant – tedy výraz „onkosféra s hexakantem“ nedává smysl. V seznamu použitých zkratk je dále napsáno, že zkratka IL-17re označuje řetězec e pro receptor IL-17e. Přesto je v textu práce IL-17re opakovaně řazen mezi cytokiny.

V úvodu na 13 stranách autorka vysvětluje termín helmintoterapie a pojednává o schopnosti helmintů modulovat imunitní odpověď hostitele. Dále se zabývá využitím exkrečních/sekrečních (E/S) produktů helmintů, extraktů z helmintů připravených i živých červů v léčbě různých autoimunitních onemocnění a alergií u lidí. Velká část úvodní kapitoly je věnovaná životnímu cyklu a imunomodulačním účinkům tasemnice *H. diminuta*. Autorka nezapomíná zmínit ani roli střevních epiteliálních buněk v rozvoji Th2 imunitní odpovědi během parazitární infekce. Lze konstatovat, že úvod úzce souvisí s experimentální částí práce a poskytuje dostatečné množství informací.

Hlavní záměr i dílčí cíle práce jsou jednoznačně definovány. Jen bych byla trochu konkrétnější a zmínila, že imunomodulační účinky extraktů a E/S produktů budou hodnoceny na základě jejich schopnosti ovlivnit expresi genů pro TNF, IL-33 a IL-17re.

V kapitole materiál a metody (11 stran) autorka popisuje získávání larvocyst a dospělců *H. diminuta*, přípravu E/S produktů a hrubých extraktů z dospělců i larválních stádií, práci se střevní epiteliální buněčnou linií z potkana, design jednotlivých experimentů, izolaci RNA i přípravu cDNA pro následnou analýzu real-time PCR. Všechny použité postupy jsou dostatečně popsány tak, aby je bylo možné zopakovat. Snad jen postup při měření koncentrace extraktů by mohl být popsán přesněji. Ke kapitole materiál a metody mám následující poznámky a připomínky:

- Vše, co lze přeložit z angličtiny do češtiny (např. fetal bovine serum, protein standard, incubator, tissue culture flasks) by mělo být napsáno česky.
- U poterníků není uveden způsob jejich získání.
- Není uvedeno, jaká pasáž střevních epitelálních buněk byla používána v experimentech.
- Ke spočítání relativní genové exprese nestačí pouze porovnat C_t testovaného genu s C_t referenčního genu. Jsou různé metody počítání relativní genové exprese, například $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoda nebo Pfafflova metoda. Vždy by mělo být uvedeno, jaká metoda byla použita.
- Překvapuje mě, že jedna hvězdička „je udělována“ už v případech, kdy hodnota p vyjde menší než 0,1, tedy nulová hypotéza je zamítána s pravděpodobností chyby až 10 %. Přijde mi to jako velké riziko. Standardně pro vznik statisticky významného rozdílu musí vyjít $p < 0,05$.
- Znázornění průběhu jednotlivých experimentů formou diagramů se mi líbí. Jestliže jsou ale diagramy nakresleny správně, znamenalo by to, že buňky nebyly stimulovány LPS po dobu 4, 8, 12 a 24 hod, nýbrž po dobu 3, 7, 11 a 23 hod.
- Popisek „Applikace HdES, HdEA, HdEL nebo výměna média“ ve čtenáři evokuje dojem, že médium bylo měněno pouze u negativní a pozitivní kontroly.

Výsledky jednotlivých experimentů jsou na 8 stranách práce prezentovány formou celkem 15 grafů. Lze konstatovat, že všechny dílčí cíle experimentální práce byly splněny. K výsledkové části bych měla dvě poznámky. Zaprvé bych si dávala pozor na použití slova „významně“, které by se mělo dle mého názoru uvádět opravdu jen tehdy, když vyjdou statisticky významné rozdíly mezi příslušnými skupinami. Například na straně 26 nejsou ve druhém odstavci správně interpretována získaná data. Má druhá poznámka se týká statistického hodnocení dat. V případě experimentů II a III byl použit Studentův t -test k porovnání tří a více průměrů, což by se nemělo dělat. Studentův t -test se užívá k porovnání pouze dvou průměrů. Užitím t -testu k porovnání více než dvou skupin autorka ještě více zvyšuje pravděpodobnost chyby prvního druhu (tedy p), kterou si už tak zvolila dosti vysokou ($p < 0,1$).

Diskuzi, která zabírá úctyhodných 11 stran, považuji za nejpovedenější část předložené práce. Autorka zde kriticky hodnotí své výsledky a porovnává je s množstvím literárních zdrojů, čímž zároveň dokazuje, že umí dobře pracovat s odbornou literaturou. K diskusní části práce nemám závažnější námitky. Snad jenom zmíním, že na straně 41 je chybně napsáno, že „působení HdEL na zánětem ovlivněné buňky vyvolalo velmi významné zvýšení genové exprese TNF- α “. K výraznému zvýšení exprese TNF- α došlo u nestimulovaných buněk, nikoli u buněk stimulovaných LPS.

V závěru pak autorka shrnuje výsledky své práce. Chybně zde uvádí, že „výrazné zvýšení genové exprese IL-33 po použití HdEA na zánětlivém modelu (s LPS) ukazuje na silný imunomodulační účinek tohoto extraktu“. K výraznějšímu nárůstu exprese IL-33 došlo u nestimulovaných epitelálních buněk, nikoli u buněk stimulovaných LPS. Chybí zhodnocení vlivu extraktů z helminta na expresi IL-17re.

Seznam použité literatury čítá celkem 127 literárních pramenů – primárních i sekundárních zdrojů. Všechny publikace jsou citovány v jednotném formátu. Všimla jsem si nicméně, že v případě některých citovaných prací jsou chybně uvedeni autoři – jména některých

autorů buď chybí a/nebo jsou naopak uvedeni lidé, kteří se na vzniku dané práce vůbec nepodíleli. V seznamu použité literatury jsem nemohla najít citaci Parker et al., 2013, která se opakovaně objevuje v textu práce.

Na autorku mám následující otázky:

- 1) Při čtení kapitoly 1.1 jsem nepochopila, jaký je přesně rozdíl mezi „Old friends“ hypotézou a „Biome depletion“ teorií. Neříkají obě hypotézy v podstatě totéž?
- 2) Jak konkrétně dochází indukci Th2 imunitní odpovědi a s ní asociované produkce cytokinů IL-4, IL-5 a IL-13 k potlačení zánětlivého procesu?
- 3) Několikrát v práci tvrdíte, že alergie patří mezi autoimunitní onemocnění. Je to ale pravda? Co mají alergie a autoimunitní onemocnění společného a v čem se naopak liší?
- 4) Receptor pro IL-17e/IL-25 je heterodimer tvořený podjednotkami IL-17RA a IL-17RB/IL-25R. IL-25 se váže k IL-17RB, ale pro vyvolání účinku vyžaduje přítomnost i IL-17RA. Vy v práci tvrdíte, že jste analyzovala expresi genu pro řetězec e (tedy IL-17RE). Jenomže IL-17RE společně s IL-17RA vytváří receptor pro IL-17c, což je prozánětlivý cytokin. Můžete toto vysvětlit?
- 5) V kapitole 3.8.3 tvrdíte, že bylo používáno 20 μ L PCR směsi tvořené 14 μ L 5x koncentrovaného master mixu, 1 μ L primerů a sondy a 5 μ L 10x naředěné cDNA. Neměly být ale užity jen 4 μ L master mixu?
- 6) Byly střevní epitelální buňky v jednotlivých experimentech stimulovány LPS po dobu 3 hodin nebo po dobu 4 hodin?

I přes všechny výše uvedené výhrady a připomínky se domnívám, že předložená práce splňuje nároky kladené na diplomové práce na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity a **doporučuji** ji proto k obhajobě. Předběžně práci hodnotím jako velmi dobrou až výbornou. O konečné známce rozhodnu na základě průběhu obhajoby.

V Českých Budějovicích dne 15. 5. 2019



Mgr. Adéla Chlastáková